使用ÄKTA™avant25进行MAb纯化的快速工艺过程研发

UNICORN™6软件控制的ÄKTA™avant25系统，用于研发单克隆抗体（MAb）纯化的两步色谱工艺过程。MabSelectSuRe™，基于蛋白A的色谱柱料（合成树脂），用来进行初始的捕获步骤；而多模式阴离子交换剂Capto™adhere，用来进行第二步精制步骤，减少不纯物。实验设计在精制步骤用来筛选上样条件。样品的pH、电导率和上样量有所变化。使用1毫升预装的HiTrap™柱子，设计运行时间少于24小时，简化的设计实施确立了工艺过程条件的稳健性。将功能性整合在UNICORN™6软件的实验设计（DoE），与HiScreen™一起使用，在大约一周的时间内将所有的工艺过程进行了优化。尽管料液研究具有挑战性，靶MAb的高产率和纯度都达到了目的。

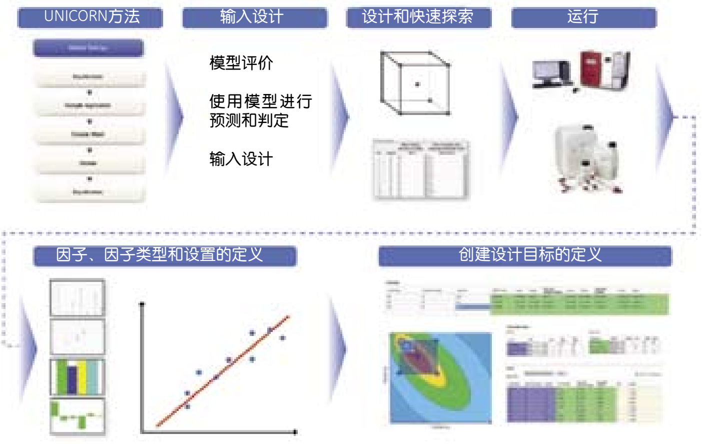


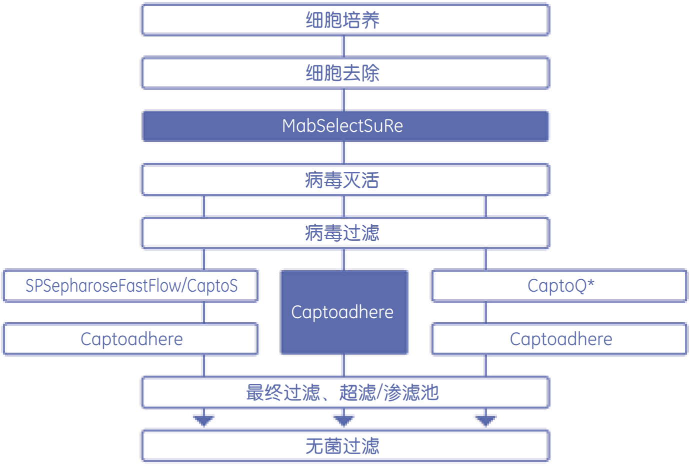
图1嵌入实验设计功能的UNICORN6软件，为简便快速的工艺过程研发而设计。在实验功能设计中，多因子同时变化，结果数据用来生成统计模型。模型经过验证后，用来产生系统图为判定提供帮助。

前言

在生物药物复合物纯化工艺过程研发中，时间和灵活性是重要条件。ÄKTA™avant25是一款专门为全自动工艺过程研发而设计的色谱系统，使用刚性色谱柱料。功能性整合在UNICORN™6软件的实验设计（DoE），增强了产率。实验设计（图1）有利于简便快速的工艺过程研发，是工艺过程研发实验室优化色谱条件、增加通量的有力工具。在单克隆抗体（MAb）纯化过程中，蛋白A是捕获步骤选择的色谱柱料，基于它的高分离性产生良好的纯度，无论大规模和小规模都可以方便地使用。因此，蛋白A为基础的柱料是进行MAb纯化的平台方法的根基。

接着，下游的数据处理可以根据不同色谱技术和技术的组合进行（尤其离子交换和疏水相互作用色谱）。一种新的MAb纯化方法，包括两步流程（图2），凭借多模式层析柱料，能进行阴离子交换和其它的相互作用类型，确保同时选择性去除抗体的二聚体和聚合物（D/A）、去除宿主细胞蛋白（HCP）、DNA和病毒（1，2）。为了充分发挥多模式层析柱料的良好特性，需要进行全面的纯化过程的优化。

ImaginationatWork



*WO2004/076485

图2经典的三步抗体纯化策略，应用MabSelectSuRe,SPSepharose™FastFlow,和Captoadhere(左边的箭头)；基于MabSelectSuRe和Captoadhere(中间的箭头)的两步策略；用于精制步骤的另外的Capto柱料三步策略(右边的箭头)。

下面的步骤（总结在表1）是使用UNICORN6控制的ÄKTAavant25进行MAb纯化的研发方法：（1）起始的亲和色谱步骤，通过pH洗脱实验决定洗脱MAb合适的pH范围；（2）分析判定动态结合载量；（3）从料液中纯化MAb；（4）纯化方法规模放大，为精制步骤准备材料；（5）纯化抗体池用来研究精制步骤的上样条件；（6）使用实验设计进行参数筛选；（7）使用实验设计进行稳健性研究。

材料和方法

柱子、设备和MAb纯化

为了纯化MAb，UNICORN6软件用来控制ÄKTAavant25系统，该系统配置两个样品进样阀，可以自动上样和清洗。使用ÄKTAavant25的压力/流量调控特性，确保在样品上样过程中没有多余的压力。本质上讲，应用MabSelectSuRe进行的所有亲和色谱，以及应用Captoadhere进行的所有离子交换，都可以使用相同的方法。装有MabSelectSuRe和Captoadhere的HiTrap(1毫升)和HiScreen(4.7毫升)预装柱，用来进行不同的实验步骤（表1）。为了优化精制步骤，装有MabSelectSuRe的XK50/20柱子用来纯化材料。

筛选Captoadhere上样条件的实验设计

已知电导率、pH和样品上样量是Captoadhere样品上样的重要参数（1）。设计一种实验设置可以同时检测许多不同的条件（因子）。使用实验设计（DoE），可以较好的达到这个目的，实验设计利用统计学辨认和定义对于工艺过程/产品有最重要影响的因子。为了获得最大的信息，认真选择设计数套实验，其中所有的相关因子不同而且同时被评估。在方法优化中，使用实验设计极大的增加了真实的最佳纯化确立的可能性。

在这个研究中，包含在UNICORN6中的完全因子实验设计（DoE），用来进行Captoadhere样品上样条件的筛选（参见表1步骤6）。该完全因子实验设计含有三个参数（样品上样量、电导率和pH），就是23=8个实验和三个中心点，总共11个实验（表2）。中心点对应192毫克/毫升柱料的上样量，电导率20mS/cm，以及pH6.75。起始材料的浓度在每毫升10.8和11.7毫克MAb之间变动，宿主细胞蛋白在平均45ppm，蛋白A在2ppm，以及二聚体和聚合物在1.9%。

表1不同柱子和使用条件的总结

步骤编号	描述和目的	柱子	缓冲液
1	MabSelectSuRe的洗脱pH的判定	HiScreenMabSelectSuRe	20mM柠檬酸盐，pH6.0到3.0
2	MabSelectSuRe的动态结合载量的判定	HiTrapMabSelectSuRe	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
3	MabSelectSuRe的MAb的纯化	HiScreenMabSelectSuRe	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
4	Captoadhere精制步骤的材料制备(规模放大)	装有MabSelectSuRe的XK 50/20柱子(柱床高度=8.4 厘米,Vc=165毫升)	PBS，pH7.4和柠檬酸盐，pH3.5
5	Captoadhere上样条件的判定	HiScreenCaptoadhere	20mM磷酸钠，20mM柠檬酸盐，pH7.8到4.0
6	Captoadhere上样条件筛选的实验设计(DoE)	HiTrapCaptoadhere	20mM磷酸钠，20mM柠檬酸盐，pH7.5,6.75,和6.0
7	Captoadhere的稳健性研究	HiTrapCaptoadhere	50mM磷酸钠，pH6.95，6.75和6.55

表2为了筛选上样条件和筛选结果，实验设计（DoE）的设计布局

实验设计编号	运行次序编号	上样量（毫克/毫升柱料）	上样电导率（mS/cm）	上样pH	回收率（%）	宿主细胞蛋白（ppm）	蛋白A(ppm)	二聚体和聚合物(%)
DOE1	8	100	10	6.0	82.3	9	<1	0.93
DOE2	1	301	10	6.0	98.0	31	<1	0.67
DOE3	10	104	30	6.0	72.6	10	<1	0.65
DOE4	7	312	30	6.0	96.4	16	<1	0.86
DOE5	6	93	10	7.5	49.0	8	<1	0.22
DOE6	3	282	10	7.5	92.9	26	<1	0.65
DOE7	11	102	30	7.5	70.3	10	<1	0.49
DOE8	9	307	30	7.5	93.2	22	<1	1.04
DOE9	5	192	20	6.75	92.2	13	<1	0.86
DOE10	4	192	20	6.75	95.1	13	<1	0.81
DOE11	2	192	20	6.75	93.4	12	<1	0.69

DoE5被排除，认为是离群值

DoE9-11是设计的中心点（上样量192毫克/毫升，电导率20mS/cm，以及pH6.75）

表3为了上样条件的稳健性研究，以及稳健性研究的结果，（DoE）的设计布局

实验设计编号	运行次序编号	上样量（毫克/毫升柱料）	上样电导率（mS/cm）	上样pH	色谱柱料批号	样品供给	回收率（%）	宿主细胞蛋白（ppm）	蛋白A（ppm）	二聚体和聚合物(%)
DOE1	2	190	17	6.55	A	Feed 2	86.7	20	<1	2.3
DOE2	9	210	13	6.55	A	Feed 1	93.9	55	2	1.2
DOE3	3	190	17	6.95	A	Feed 1	76.1	25	<1	1.7
DOE4	10	210	13	6.95	A	Feed 2	83.7	55	2	1.5
DOE5	4	190	13	6.55	B	Feed 2	86.4	25	<1	2.1
DOE6	5	210	17	6.55	B	Feed 1	85.3	55	2	1.3
DOE7	7	190	13	6.95	B	Feed 1	78.1	15	<1	1.9
DOE8	6	210	17	6.95	B	Feed 2	88.3	25	<1	2.2
DOE9	1	200	15	6.75	A	Feed 1	81.9	20	<1	2.5
DOE10	8	200	15	6.75	A	Feed 1	85.4	55	1	1.7
DOE11	11	200	15	6.75	A	Feed 1	83.2	25	<1	2.4

DoE9-11是设计的中心点（上样量200毫克/毫升，电导率15mS/cm，以及pH6.75）

MAb的洗脱性能定义为由峰顶点的pH决定（近似5.79），在这样的设计中一般用来定义pH的下限。然而，在这个例子中，在低pH值和低电导率（小于10mS/cm）时，样品发生了沉淀。由于这个原因，设计中pH的下限设置为pH6.0，而电导率维持在大于等于10mS/cm。设计中pH的上限通常选择为比洗脱pH高2个pH，在这个例子中为7.5。电导率在10至30mS/cm之间变化，上样量在100到300毫克MAb/毫升柱料之间。

Captoadhere的稳健性研究

稳健性研究在实验设计筛选确立的条件下进行，使用此条件范围内不同的pH、电导率和上样量。此外，还包括两种不同的料液，以及两种不同货号的柱料。两种料液都比实验设计筛选使用的料液污染程度更高。简化的设计有五个参数，即设置了8个实验和3个中心点，总共11个实验（表3）。两个料液的起始材料浓度在12.7和14.7毫克MAb/毫升之间变化，两个料液的宿主细胞蛋白是80ppm。料液1的蛋白A是3ppm，料液2的是4ppm。料液1的二聚体和聚合物平均值是5.3%，而料液2的是3%。DoE9-11是设计的中心点（上样量200毫克/毫升柱料，电导率15mS/cm，pH6.75）。

产量、宿主细胞蛋白清除、聚合物含量和蛋白A泄露实验的检测回收率和浓度的判定

不仅通过使用消光系数1.49在280纳米测量紫外读数可以测定浓度，使用在ÄKTAexplorer™10色谱系统上HiTrapMabSelectSuRe1毫升柱子通过亲和层析色谱也可以进行。

二聚体/聚合物分析

使用与ÄKTAexplorer10系统进行连接的两个互连的Superdex™2005/150GL柱子，通过凝胶过滤（分子筛色谱）进行了穿透组分的分析（数据未显示）。每个样品小份进行了柱子上样，在PBS溶液中以流速0.35毫升/分钟运行15分钟。聚合物含量测定通过280纳米测量紫外和计算峰面积比例进行判定。

宿主细胞蛋白（HCP）和配基泄露的分析

宿主细胞蛋白的水平测定，通过使用商业化的抗CHO宿主细胞蛋白抗体（Cygnus技术有限公司）进行。实际上，在Gyrolab™工作站LIF(GyrosAB,乌普萨拉,瑞典)上使用GyrolabBioaffy™20HC实验室微盘，ELISA方法学也为大家接受。使用商业化的ELISA试剂盒（Repligen公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国）的改良操作规程，进行配基泄露（MabSelectSuRe蛋白A配基）的测定。

SDS-PAGE分析

样品使用1M氢氧化钠调整pH到8.5。使用二甲基甲酰胺制备CyDye™DIGE荧光最小染色法染料（Cy5）工作溶液（12.5微升二甲基甲酰胺溶解5nmolCyDye）。Cy5溶液（1微升）加入到50微克蛋白质中，接着在暗室冰浴孵育30分钟。反应使用1微升10mM赖氨酸进行终止。未还原的样品（每孔5微克）在Multiphor™II平板电泳系统进行分离，使用预制的ExcelGel™SDS梯度8–18凝胶。凝胶在Ettan™DIGE扫描仪进行扫描。由于MAb数量和污染物数量的显著不同，扫描过程使用了几个不同的光电倍增管（PMT）电压。

结果和讨论

我们对蛋白A为基础的捕获步骤，和多模式阴离子交换的精制步骤组成的两步纯化方法进行了研发。使用UNICORN6控制的ÄKTAavant25系统，工艺过程研发在大约一周的时间内完成。方法研发获得了高纯度MAb的高回收率。获得的纯度一般认为适合绝大多数治疗性使用，但是也可以使用三步纯化进行提高。

使用的材料具有挑战性，主要由于样品的沉淀，运行第二步必须提高电导率。

低电导率通常会导致更好的污染物去除（1）。随着时间的增加，以及在低pH和电导率的情况下，另外的挑战是MAb聚合增加，这样第一次实验使用的样品比后来使用的样品二聚体和聚合物较低，例如，在稳健性研究中。

使用MabSelectSuRe进行MAb的捕获

MabSelectSuRe洗脱pH和动态结合载量的测定

如图4所示，MAb洗脱在线性pH梯度下进行。峰顶点的洗脱pH值是3.67，10%峰顶点值是3.56（也就是，下降处）。基于这一结果，决定洗脱pH使用3.5，可以得到高产量和窄的洗脱峰。在10%拐点（10%DBC）处，动态结合载量在保留时间2.4分钟和4分钟，分别测定为21和40毫克/毫升。

柱子: HiScreenMabSelectSuRe,4.7ml
样品: 1ml澄清的CHO料液，每毫升含有1.72mgMAb
结合缓冲液: 20mM柠檬酸盐,pH6.0
洗脱缓冲液: 20mM柠檬酸盐,pH3.0
梯度: 线性,10个柱体积的20mM柠檬酸盐缓冲液pH6.0到3.0
流速: 0.5ml/min
系统: ÄKTAavant25

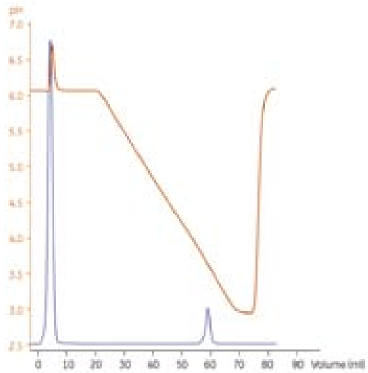


图4HiScreenMabSelectSuRe的洗脱pH测定。

MabSelectSuRe的Mab纯化

图5显示了HiScreenMabSelectSuR柱子进行MAb纯化的色谱图，作为例子。回收率达到99%，宿主细胞蛋白为25ppm，二聚体和聚合物为0.8%，沥滤的蛋白A为6ppm。

柱子: HiScreenMabSelectSuRe,4.7ml
样品: 112.5ml澄清的CHO料液，每毫升含有1.17mgMAb
结合缓冲液: PBS,pH7.4
洗脱缓冲液: 50mM柠檬酸盐,pH3.5
流速: 1.2ml/min,保留时间4min
梯度: 一步，从结合缓冲液到洗脱缓冲液
在位清洗(CIP): 两个柱体积的0.1MNaOH,接触时间15min
系统: ÄKTAavant25

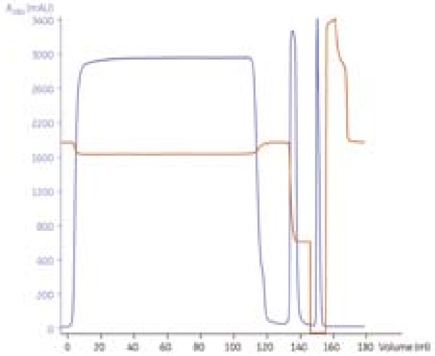


图5HiScreenMabSelectSuRe的MAb的纯化。穿透之后的第一个峰是纯化的MAb，第二个峰含有来自CIP的污染物。pH（红色曲线）显著下降的原因是，氢氧化钠上样时，pH监控器的旁路作用记录的结果，因此，不是纯化过程中此点pH的真实测量值。

在Captoadhere精制步骤之前使用XK50/20柱子进行规模放大

为了精制步骤实验的材料制备，建立的方法应用在XK50/20柱子上进行规模放大（数据未显示）。ÄKTAexplorer100系统用来进行规模放大。XK50/20纯化的抗体池，接下来用于在Captoadhere上进行筛选和稳健性运行。与先前的运行相比，在XK50/20规模放大中，宿主细胞蛋白、蛋白A、二聚体和聚合物的水平较高。

使用Captoadhere进行精制步骤结合和洗脱条件的初步筛选

3mgMAb在pH7.8时上样到HiScreenCaptoadhere柱子上。从pH7.8到4.0进行线性pH梯度的洗脱。MAb洗脱在相对宽阔的峰形中进行（图6）。峰顶点的洗脱pH是5.79。为了进一步优化，洗脱位置定义为设计的pH下限。然而，由于低pH和电导率会引起沉淀，设计的pH下限定为6.0，电导率维持在大于等于10mS/cm。

柱子:	HiScreenCaptoadhere,4.7ml
样品:	来自1mlHiScreenMabSelectSuRe的洗脱池，应用起始缓冲液稀释到3mg/ml
起始缓冲液:	20mM磷酸钠,20mM柠檬酸盐,pH7.8
洗脱缓冲液:	20mM磷酸钠,20mM柠檬酸盐,pH4.0
梯度:	线性,20mM磷酸,20mM柠檬酸盐,pH7.8–4.0，10倍柱体积
流速:	2.4ml/min
系统:	ÄKTAavant25

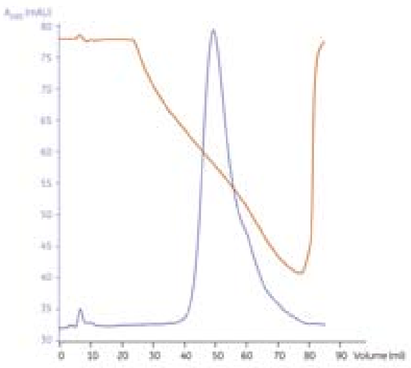


图6HiScreenCaptoadhere上结合和洗脱条件的测定。

使用实验设计进行上样条件的筛选

图7显示了应用HiTrapCaptoadhere进行筛选设计，产生的代表性典型的穿透色谱（MAb在穿透中洗脱），此设计的数据总结在表2。此色谱结果对于应用筛选目的实验设计的中心点具有代表性（表2）。

柱子:	HiTrapCaptoadhere,1ml
样品:	来自HiScreenMabSelectSuRe洗脱池(设计的中心点,也就是pH6.75,电导率15mS/cm，上样量200mg/ml柱料)
起始缓冲液:	20mM磷酸钠,20mM柠檬酸盐,pH6.75使用氯化钠将电导率调整为15mS/cm
再生缓冲液:	0.1M醋酸,pH3.0
梯度:	在起始缓冲液，再生缓冲液和CIP之间步骤梯度
流速:	2.0ml/min
CIP:	1MNaOH,接触时间15min
系统:	ÄKTAavant25

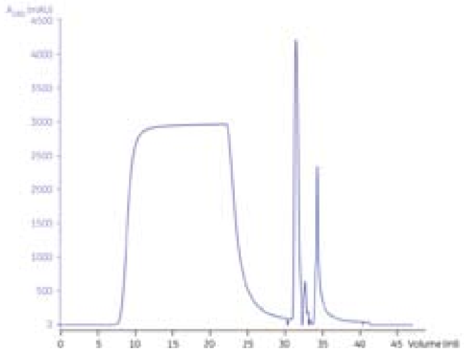


图7HiTrapCaptoadhere筛选设计的色谱图。MAb从穿透液中洗脱，而在大约32毫升和35毫升两个峰是分别来自于CIP的聚合物和不纯物。

图8总结了实验设计筛选的结果。通过使用“数据模型吻合小结（Summaryoffit）”、“系数图（Coefficientplot）”和“等值线图（Contourplots）”，结果以三种不同的方式进行了可视化展示。分析了三个响应值，回收率、宿主细胞蛋白去除、二聚体和聚合物（D/A）去除。第四种响应值，蛋白A泄露太低，无法进行统计学模型的设计。实际上，在来自HiScreenMabSelectSuRe柱子洗脱组分中观察的蛋白A泄露，也已经太低。

在Summaryoffit中，对于回收率和聚合物模型，响应值的百分比偏差，通过模型（R2）>0.8进行解释，显示为良好的模型吻合。对于两个模型的所有因子，模型（Q2>0.5）达到了高预测能力（根据交互证实的模型，预测响应值的百分比偏差，Q2）。R2大于0.5时，显示为强有力的模型；在大于0.9时，为极佳的模型。对于宿主细胞蛋白去除，获得了中等质量和低有效性的模型。这个模型得到的重复变化测量，重复性是大于0.5，显示实验过程中误差最小和控制良好。

系数图显示回归系数和置信区间。模型中的重要系数都保留了；如果因子间的相互影响发现显著性，一些无关紧要的系数也予以保留。

等值线图显示两个因子对于特定响应值的效应。

正如期望的一样，增加上样量正性影响回收率，而污染物清除率在较低上样量时有所改善。

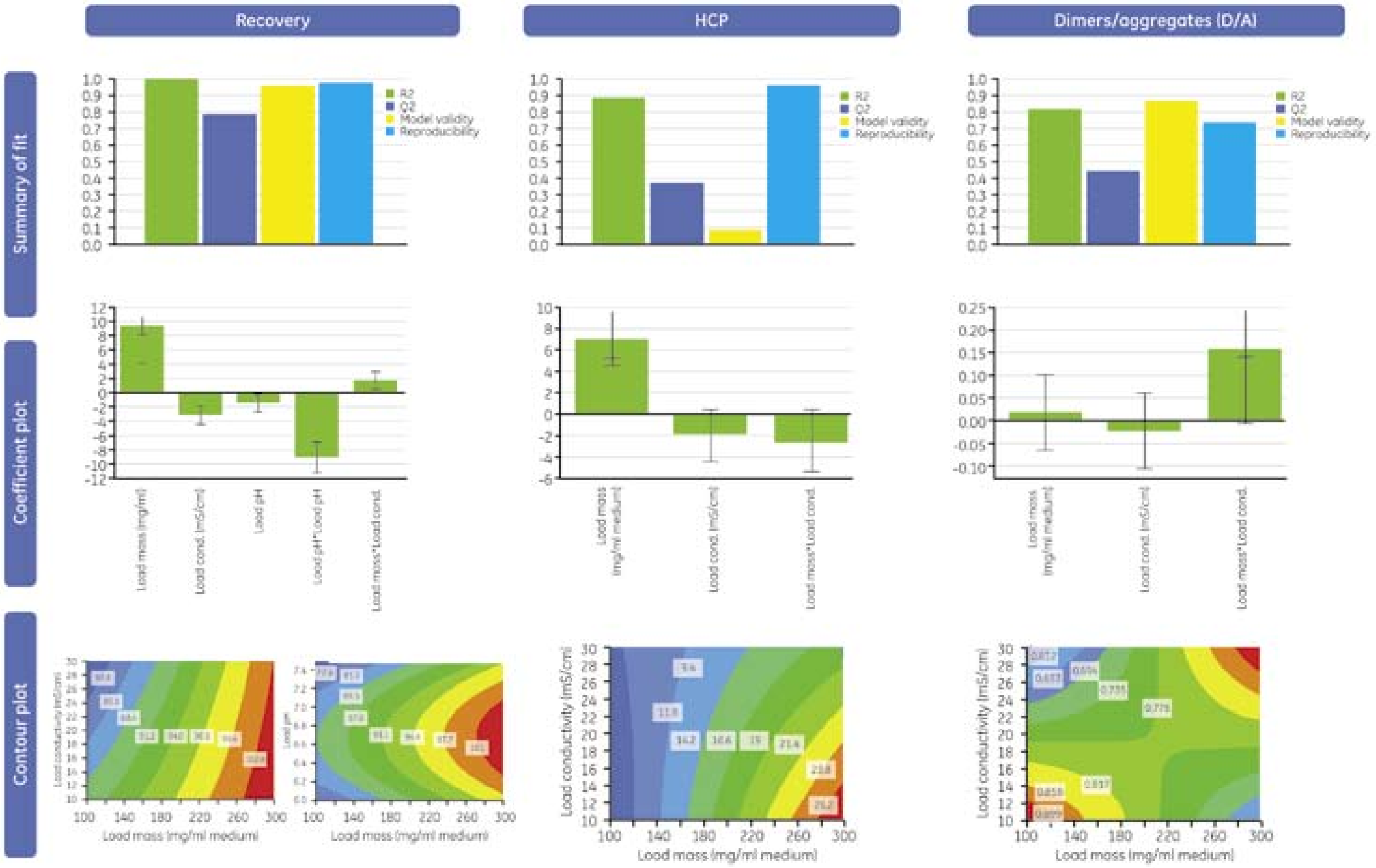


表8Captoadhere步骤条件筛选的实验设计结果。分析的三个反应分别是回收率、宿主细胞蛋白、二聚体和聚合物。结果以三种不同的方式进行了可视化展示：“数据模型吻合小结（Summaryoffit）”、“系数图（Coefficientplot）”和“等值线图（Contourplots）”。

Captoadhere的稳健性研究

表3总结了结果。图9显示了单独的实验设计进行的SDS-PAGE分析，使用了两种不同的料液，图10显示了稳健性研究吻合小结（Summaryoffit）图。获得的结果中无法建立模型，这样的条件被认为是稳健性的。这个观点得到了SDS-PAGE结果的支持，在可见的11个实验设计的泳道或运行中，没有显著性差异（图9）。

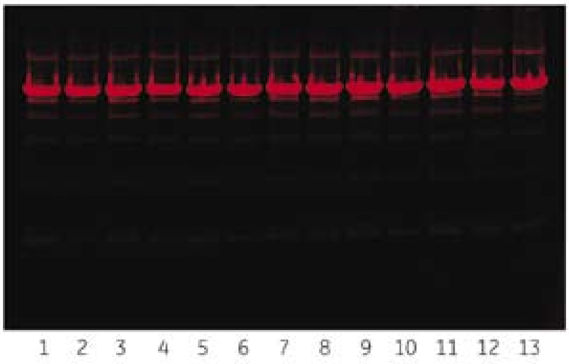


图9实验设计稳健性研究中单独运行的SDS-PAGE结果，使用ExcelGelSDS梯度8–18凝胶，在非还原条件下进行分离。凝胶显示的是Cy5。泳道1-11分别对应实验设计编号的1-11。泳道12-13分别是料液1和2。

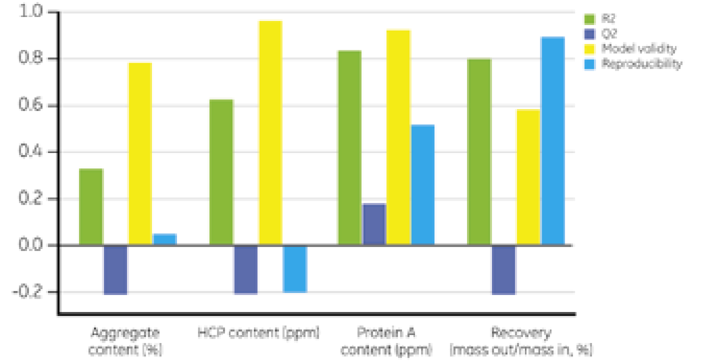


图10来自实验设计稳健性研究的吻合小结。二聚体和聚合物、宿主细胞蛋白、蛋白A含量和回收率的结果。

结论

使用ÄKTAavant25色谱系统和UNICORN6软件，结合预装的HiTrap和HiScreen柱子，在大约一周的时间内，进行了两步色谱工艺过程的研发。应用独一无二的选择性和可能适用于ÄKTAavant25,UNICORN6,MabSelectSuRe和Captoadhere预装柱的常见方法条件，完成了简洁的方法优化。ÄKTAavant25色谱系统灵活的设计，允许标准流速配置的修改；在此研究中，两个样品进样阀用来进行自动样品上样和不丢失样品的清洗。使用该系统的新颖的压力/流速调控特性，进行分离过程，确保了上样过程压力增强的最小化。对于Captoadhere的精制步骤的筛选和条件优化，实验设计方法非常有效。UNICORN6软件的实验设计模块有助于分离策略的快速设定，决定最佳和稳健的条件，保证高重复性。

参考文献

1. Applicationnote: Optimization of loading conditions on Capto adhere using Design of Experiments,28-9078-89 Edition AA,GE Healthcare.
2. Eriksson,K.etal.MAb contaminant removal with a multimodal anion exchanger.A platform step to follow protein A.BioProcess International,7(2)52–56(2009).

订货信息

产品	货号
AKTAavant25色谱系统	28-9308-42
UNICORN6本地和远程工作站授权，有DVD	28-9589-93
UNICORN6本地和远程工作站授权，没有DVD（仅可下载）	28-9589-95
HiTrapMabSelectSuRe,5 × 1ml	11-0034-93
HiTrapCaptoadhere,5 × 1ml	28-4058-44
HiScreenMabSelectSuRe,1 × 4.7ml	28-9269-77
HiScreenCaptoadhere,1 × 4.7ml	28-9269-81
Superdex2005/150GL,1 × 3ml	28-9065-61
Cy5DIGE荧光最小染色法染料,5nmol	25-8008-62
XK50/20柱子,50mm内径 × 18cm	18-1000-71
ExcelGelSDS梯度8–18,6块预制胶	80-1255-53
MultiphorII电泳系统	18-1018-06
EttanDIGE成像仪	63-0056-42

通用电气医疗集团工艺研发工作流程

通用电气医疗集团的BioProcessTM系统、色谱柱料、柱子和96孔板，涵盖了从捕获到精制所有的纯化步骤，涵盖了从研发和前期研究到常规生产所有的工作规模。ÄKTAavant25具有支持BioProcess柱料（如MabSelect和Capto）的流速和压力特性。这些BioProcess柱料在高流速提供了增强的动态结合载量。使用ÄKTAavant25和UNICORN控制软件，以及高流速BioProcess柱料，降低了工艺过程的时间，增加了重复性，并且确保了方便的规模扩大。

所有的柱料使用经过认证的方法制造，并且经过检测，符合严格的质量要求。无忧订货和物流渠道确保了生产规模柱料的可靠供应。常规的支持文件（RSF）可以提供，帮助进行生产认证和递交给主管机构。

通用电气(中国)医疗集团

网址：www.gelifesciences.com.cn
邮箱：lifesciences@ge.com
免费咨询电话：800-810-9118

如需更多产品信息，请致电：

香港
香港九龙旺角亚皆老街 8 号
朗豪坊办公大楼 12 楼
电话：(852)2100 6314
传真：(852)2100 6338

北京
北京经济技术开发区永昌北路 1 号
电话：(010)5806 8888 转69417
传真：(010)6787 1162
邮编： 100176

上海
上海市浦东新区张江高科技园区华佗路 1 号
电话：(021)3877 7888 转60276
传真：(021)3877 7449
邮编： 201203

广州
广州市建设六马路 33 号
宜安广场 1212 室
电话：(020)8363 3828 转67961
传真：(020)8363 3291
邮编： 510060

成都
四川省成都市新华大道文武路 42 号
新时代广场 12 层 A-C 座
电话：(028)86782581
传真：(028)86782582
邮编： 610017

西安
西安市南大街 30 号
中大国际商务会馆 606 号
电话：(029)87203288
传真：(029)87203289
邮编： 710002

哈尔滨
哈尔滨市南岗区红军街 15 号
奥威斯发展大厦 25 层 A 座
电话：(0451)5300 9566 转72300
邮编： 150001

沈阳
沈阳市和平区和平北大街 69 号
总统大厦 C 座 907 室
电话：(024)22812468
传真：(024)22812121
邮编： 110003

青岛
青岛市香港中路 61 号
阳光大厦 2208 室
电话：(0532)85729111
传真：(0532)85719153
邮编： 266071

南京
南京市汉中路 2 号
金陵饭店世界贸易中心 1258/1259 室
电话：(025)84509386
传真：(025)84723600
邮编： 210005

济南
济南市乐源大街 150 号
中信广场 618 房间
电话：(0531)86116900 转67565
传真：(0531)86907134
邮编： 250011

杭州
浙江省杭州市曙光路 122 号
世界贸易中心世贸大厦 906 室
电话：(0571)87970862
传真：(0571)87970860
邮编： 310007

重庆
重庆市渝中区民生路 235 号
阳光商务大厦 23 层 C 座
电话：(023)6374 9388
传真：(023)6374 9398
邮编： 400010

厦门
厦门市厦禾路 189 号
银行中心 1815-1816 室
电话：(0592)2681280
传真：(0592)2681283
邮编： 361003

昆明
昆明市三市街 6 号
柏联广场写字楼 1005 室
电话：(0871)3157017
传真：(0871)3157289
邮编： 650021

南宁
广西省南宁市桃园路 67 号
石油大厦 1508 室
电话：(0771)2521666 转115
传真：(0771)2521555
邮编： 530022

武汉
武汉市建设大道 568 号
新世界国贸大厦 1 座 3115、3116 室
电话：(027)6885 5731
传真：(027)8577 4677
邮编： 430022

长沙
长沙市韶山北路 139 号
湖南文化大厦 1905 室
电话：(0731)412 9178-72427
传真：(0731)413 4257
邮编： 410011

天津
天津市河西区马场道 59 号增 1 号
平安大厦 B 座 16 层 A
电话：(022)5819 2830
传真：(022)8558 9982
邮编： 300203

GE imagination at work

2009 年 9 月印刷于北京